

POLIMORFISMO DE LIPOSOMAS

ARACELI ARTEAGA JIMÉNEZ, MARÍA LETICIA VALENZUELA SÁNCHEZ, ADOLFO FONTES, RICARDO LÓPEZ ESPARZA*

RESUMEN

Revisamos las teorías actuales que explican los cambios de forma de liposomas. Incluimos resultados experimentales de Microscopía Óptica (MO), Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) y Microscopía Electrónica de Criofractura (TEM) que muestran la variedad de formas y tamaños de liposomas obtenidos por el método de hidratación. Presentamos una explicación sencilla del posible mecanismo de formación de liposomas helicoidales y la necesidad de formular una teoría basada en Termodinámica de No Equilibrio para entender los cambios de topología de estas fascinantes estructuras.

Palabras clave: Liposomas, microscopía, membranas, elasticidad.

M. C. ARACELI ARTEAGA JIMÉNEZ
Instituto de Física,
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Correo: arateaga@gmail.com
M. C. MARÍA LETICIA VALENZUELA SÁNCHEZ
Departamento de Investigación en Polímeros y
Materiales, Universidad de Sonora
Correo: leticiavalenzuela07@gmail.com

DR. ADOLFO FONTES
Departamento de Sistemas de Información y Co-
municaciones,
Universidad Autónoma Metropolitana – Lerma
Correo: adolfo.fontes@alumni.manchester.ac.uk
DR. RICARDO LÓPEZ ESPARZA
Departamento de Física, Universidad de Sonora
Correo: ricardo.lopez@correo.fisica.uson.mx

*Autor para correspondencia: Dr. Ricardo López Esparza
Correo electrónico: ricardo.lopez@correo.fisica.uson.mx
Recibido: 27 de Marzo del 2015
Aceptado: 8 de Junio del 2015
ISSN: 2007-4530

INTRODUCCIÓN

Los liposomas [1] son estructuras cerradas compuestas de bicapas de moléculas de fosfolípido, las cuales poseen un carácter anfifílico. Esto significa que la sección polar (cabeza hidrófila) de la molécula se orienta hacia el agua mientras que la sección opuesta (cola hidrófoba, hidrocarbonada) repele a las moléculas de agua (Figura 1a).

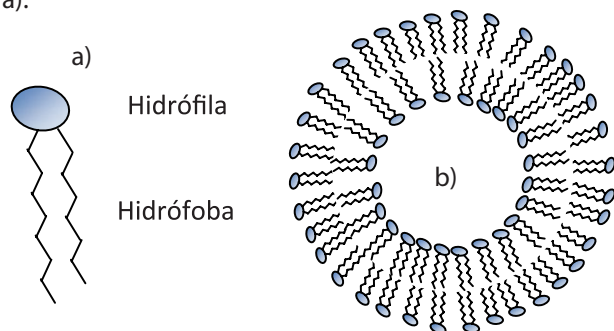


Figura 1. a) Secciones de una molécula de fosfolípido. b) Liposoma esférico en medio acuoso. Las moléculas de fosfolípido orientan su sección hidrófila producto de la interacción con las moléculas de agua.

Gracias a esta propiedad, al encontrarse inmersas en un solvente acuoso las moléculas anfifílicas se autoensamblan en estructuras conformadas por membranas. Entre las cuales se encuentran los liposomas (Figura 1b) y las fases lamelar y esponja. Por su compatibilidad con los sistemas celulares, los liposomas tienen gran importancia en la investigación básica y aplicada. En la primera, las membranas del liposoma sirven como modelo para estudiar la interacción de proteínas con el citoplasma, la difusión confinada de moléculas [2] y la fusión celular [3, 4]. De igual manera, han sido utilizadas para medir la elasticidad de membranas y la formulación de teorías que permitan explicar la traspotación de moléculas en el aparato de Golgi [5]. Tienen múltiples aplicaciones en la industria cosmética [6] y farmacéutica en la vectorización de moléculas [7]. En combinación con polímeros biocompatibles como polietilenglicol (PEG), han sido utilizados para transportar medicamentos al interior de la célula, permitiendo una liberación controlada del medicamento [8].

Muchos factores influyen el tamaño y forma de los liposomas. El método de hidratación por ejemplo, base para los métodos de electroformación, sonicación y extrusión permite elaborar liposomas multilamelares polidispersos tipo cebollas, del orden de 1-10 micras de diámetro. Si esta muestra se extruía, los liposomas pierden su multimeralidad y se convierten en liposomas con una sola bicapa lipídica (unilamelares), monodispersos, con diámetros en el orden de nanómetros. Por el contrario, someter esta muestra a un campo eléctrico variable en el método de electroformación, produce liposomas gigantes unilamelares del orden de 20-80 micras de diámetro con

mayor monodispersión. Por su tamaño, los liposomas elaborados por re-hidratación o electroformación, son observables por Microscopía Óptica (MO) o Contraste de Interferencia Diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) y son muy útiles para estudiar la interacción membrana macromolécula mediante técnicas como pinzas ópticas o micropipetas.

La concentración de fosfolípido, pH y sales presentes en el solvente, temperatura y carga de la cabeza polar, longitud e insaturación de la cola son parámetros importantes a controlar para la elaboración de liposomas. Una combinación de estas variables puede llevar a la coexistencia de liposomas esféricos, cilíndricos, helicoidales, combinación cilindro y agregados en liposomas elaborados por hidratación (Figuras 2 y 3).

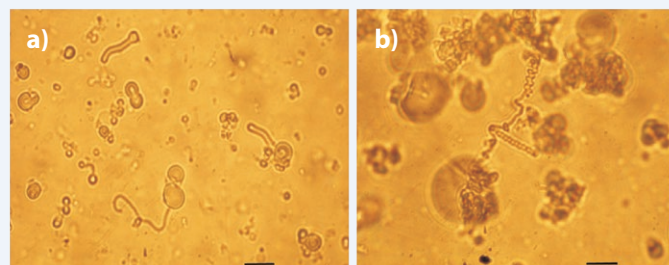


Figura 2. a) Liposomas esféricos y cilíndricos de DOPS preparados por el método de hidratación. b) Liposoma helicoidal en presencia de agregados de liposomas de DOPS. Imagen obtenida por MO. La escala equivale a una longitud de 20 μm . Las condiciones experimentales se presentan en el Anexo.

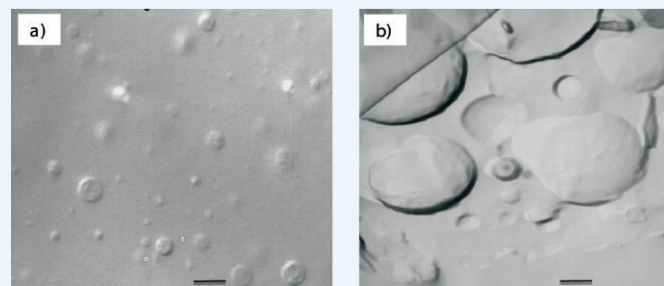


Figura 3. Liposomas esféricos de SOPS preparados por el método de hidratación: a) DIC (escala equivalente a 20 μm); b) Criofractura (escala equivalente a 200 nm). Las condiciones experimentales se presentan en el Anexo.

La coexistencia de este polimorfismo de liposomas es una de las preguntas abiertas que se bosqueja en este artículo. En este trabajo de divulgación presentamos las teorías más usadas para explicar la formación y cambio de forma de liposomas. Combinamos esta información con resultados experimentales originales obtenidos por MO, DIC y Microscopía Electrónica (TEM) en liposomas preparados por re hidratación. Nuestro objetivo es analizar sucintamente estas teorías y la influencia de parámetros fisicoquímicos en los cambios de forma de

liposomas y presentar las preguntas que permanecen abiertas en este sentido. El artículo está dividido en tres secciones. La primera corresponde a la Introducción. En la sección II, se presentan brevemente las teorías geométrica y termodinámica de Israelachvili, además de la teoría de Helfrich de constante elástica de membrana. Insertamos algunas imágenes obtenidas por MO, DIC y TEM. La sección III muestra las conclusiones del trabajo. De manera adicional, se incluye un Anexo para los Materiales y métodos utilizados y una sección en línea con Material Suplementario que permite visualizar algunas geometrías, su desplazamiento debido al movimiento browniano y la desestabilización de un liposoma helicoidal.

TEORÍAS PARA DESCRIBIR LOS CAMBIOS DE FORMA

El proceso que lleva a cada forma de liposoma parece quedar claro en geometrías esféricas o cilíndricas. Los liposomas, como las micelas, no son estructuras rígidas o estáticas. Las moléculas que conforman las bicapas lipídicas del liposoma entran y salen de la estructura manteniendo un radio promedio. De igual manera, las moléculas difunden a lo largo de la bicapa debido al movimiento browniano y otras se trasladan de una monocapa (perpendicular a la bicapa) a otra en un proceso difusivo de flip-flop (esta translocación implica un tiempo de difusión grande comparado al tiempo de difusión en la dirección lateral). Por otra parte, el liposoma como un todo, se mueve en el solvente como resultado de las fluctuaciones térmicas e interactúa con los demás liposomas por medio de interacciones de Van der Waals, eléctricas o entrópicas.

Enfoque estructural de la molécula

Uno de los modelos más sencillos para explicar las formas de autoensamblamiento de moléculas de fosfolípido, se debe a Israelachvili [9]. La molécula de fosfolípido en este modelo está caracterizada en términos del parámetro de empaquetamiento e ,

$$e = \frac{v}{al_0} \quad (1)$$

Donde v es el volumen ocupado por la molécula, a es el área de la cabeza polar y l_0 es la longitud máxima que puede ocupar la cola hidrófoba en este volumen (Figura 4).

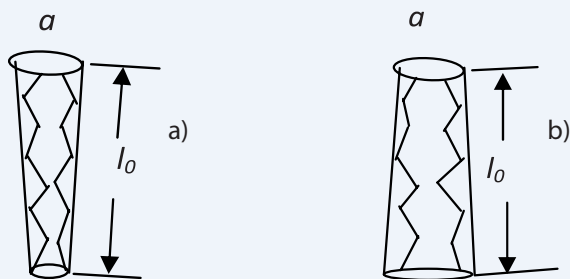


Figura 4. Definición del parámetro de empaquetamiento de acuerdo a Israelachvili [9]. Las diferencias en área de cabeza polar y volumen ocupado por la cola de a) y b) llevan a diferentes topologías.

De acuerdo a este modelo, cambios en alguno de los parámetros geométricos pueden inducir cambios de morfología. Por ejemplo, una molécula puede aumentar su área de cabeza polar a por un fenómeno de solvatación y la forma de la molécula cambiaría entonces de una forma de cono truncado (Figura 4a) a otra de cono (Figura 4b), o una combinación de ambas geometrías, lo que llevaría a favorecer liposomas esféricos o cilíndricos. Por otra parte, la reducción de la longitud de la cadena hidrófoba debido a su insaturación conlleva un aumento en e y posibles cambios de forma. Si bien este modelo geométrico permite entender la formación de liposomas con estas geometrías, no considera formas más complejas como liposomas tipo trenzas (helicoidales), coexistencia de topologías, los efectos combinados de la temperatura que afectan las interacciones entre cabezas polares y las propiedades mecánicas de membrana.

Descripción termodinámica de autoensamblado

Termodinamicamente, los liposomas se forman cuando existe una diferencia de potencial químico (energía libre por mol), μ , entre el agregado y las moléculas de fosfolípido (monómeros) disueltos en el medio [9]. En la descripción de Israelachvili, el potencial químico promedio para formas esféricas y cilíndricas está dado por la ecuación:

$$\mu_N^0 = \mu_\infty^0 + \frac{\alpha k_B T}{N^p} \quad (2)$$

Donde μ_∞^0 es el potencial químico de una molécula en un agregado infinito, α es una constante positiva que depende de la intensidad de las interacciones intermoleculares, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, N el número de monómeros que forman el agregado (número de agregación) y p es un número que depende de la forma de este agregado. Para bastones (o cilindros), discos y esferas, p tiene los valores $1/2$, $1/3$, respectivamente. La ecuación 2 expresa que el potencial químico para las tres estructuras mencionadas sigue la secuencia: $1/N$ (cilindros) $>$ $1/N^{1/2}$ (discos) $>$ $1/N^{1/3}$ (esferas). Así, para el polimorfismo presentado en la figura 2 se tienen varios valores de N con sus correspondientes del parámetro p . La pregunta que surge ahora es: ¿Cómo conciliar este polimorfismo mediante una teoría que considere la estabilidad global del sistema? Por otra parte, si consideramos que la energía libre es el trabajo que requerimos para reducir la entropía (o aumentar el orden, construyendo estructuras con energía mínima), lo que dice la ecuación es que si tenemos un liposoma cilíndrico, por ejemplo, y este cambia a una forma esférica, el proceso inherente a este cambio es un proceso de inestabilidad local. Como tampoco es un sistema abierto (la muestra como un todo), se requiere una teoría que considere otros parámetros físicos o bien una termodinámica de no equilibrio local. Otra manera de entender el cambio de forma está fundamentada en las propiedades mecánicas de membrana y el concepto de curvatura de membrana

introducido por Helfrich [10, 11], la cual puede aplicarse a partir de la formación de una bicapa.

Módulo elástico de membrana. Descripción de Helfrich

Tomando como base la parametrización de Monge de radios de curvatura asociados a topologías, Helfrich expresa la energía libre por unidad de área de una membrana mediante la ecuación:

$$E = \frac{1}{2} \iint k(c_1 + c_2 - c_0)^2 dS + \iint \bar{k}(c_1 c_2) dS \quad (3)$$

Donde k es la constante elástica de membrana que está asociada a las fluctuaciones térmicas y que controla la flexibilidad de la membrana (k grande implica una membrana muy rígida poco deformable; k pequeña significa tener una membrana muy flexible), c_0 la curvatura espontánea (asociada a la inhomogeneidad química de las monocapas que forman la membrana) y \bar{k} el módulo gaussiano asociado a la topología en particular; c_1 y c_2 son las principales curvaturas de la superficie en algún punto de la membrana. De acuerdo al teorema de Gauss-Bonnet, la integral sobre una superficie cerrada del segundo término de la ecuación es una constante ($4\pi\bar{k}$), y por lo tanto sólo el primer término es relevante para estudiar la topología de liposomas. Para el caso de un liposoma esférico de radio r_0 , formado de moléculas del mismo tipo ($c_0 = 0$) y $c_1 = c_2 = 1/r_0$, se tiene que la energía elástica (ignorando el segundo término de la ecuación 3) es:

$$E_{elástica} = \iint_S \frac{1}{2} k(2c)^2 dS = 2k \iint_S c^2 dS = 2k \frac{1}{R^2} \int 8\pi r dr = 8\pi k \quad (4)$$

Que expresa que la energía elástica es independiente del radio del liposoma. Un segundo caso interesante es el correspondiente a un liposoma cilíndrico. Procediendo de forma análoga al caso anterior, la energía elástica de un liposoma cilíndrico de radio r_c y longitud l_c es:

$$E_{elástica} = \frac{\pi k l_c}{r_c} \quad (5)$$

La variación de esta energía con respecto al radio del cilindro revela la existencia de una fuerza por unidad de área normal a la superficie del cilindro [10]:

$$\vec{F}_n = \frac{k_c}{r_c^3} \hat{n} \quad (6)$$

Con \hat{n} un vector unitario normal a la superficie del liposoma cilíndrico. Esta fuerza es estabilizada por las fuerzas hidrofóbicas que mantienen unidas a las moléculas en esta topología. Un cambio topológico se puede dar si existe una fuerza externa que desestabilice estas fuerzas, por ejemplo, una fuerza generada por diferencia de presión. Helfrich considera esta posibilidad e introduce la presión osmótica en el sistema, ampliando la ecuación 2 (sin el término gaussiano) a una forma más generalizada [12]:

$$E = \frac{1}{2} \iint [k(c_1 + c_2 - c_0)^2 dS + \Delta p \int dv + \lambda \iint dS] \quad (7)$$

Donde Δp es la diferencia de presión osmótica entre el exterior y el interior del liposoma y λ un esfuerzo de tensión. La diferencia de presión osmótica para una vesícula esférica se puede calcular del segundo término, obteniendo:

$$\Delta p = \frac{2k_c}{r_e^3} (6 - c_0 r_e) \quad (8)$$

La expresión permite entender que, en palabras de Zhong-can y Helfrich, "la estabilidad de un liposoma esférico depende de Δp , c_0 , y r_0 ".

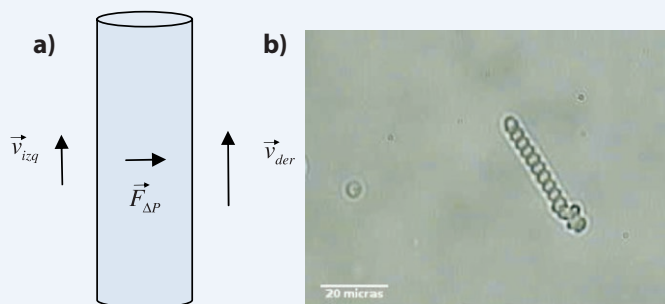


Figura 5. a) Esquema de las fuerzas generadas por el flujo asimétrico sobre la superficie de un cilindro. b) Liposoma helicoidal de DOPS (Imagen de MO).

Si consideramos ahora un liposoma cilíndrico que se encuentra sometido a flujo (Figura 5), la diferencia de velocidades, como fue anotado por Paredes et al en su explicación de la formación de liposomas helicoidales [13] produce una diferencia de presiones en la dirección perpendicular a la superficie del cilindro, la cual podemos asociar a una fuerza $\vec{F}_{\Delta P}$. Tal fuerza, cambia la presión osmótica de modo que se desestabiliza localmente la superficie del liposoma. Este fenómeno lleva a que el cilindro, que no es rígido, se curve en esos puntos. Por otra parte, si el flujo se mantiene, moléculas de fosfolípido ubicadas en la región de inestabilidad son trasladadas en dirección del flujo. El liposoma es entonces sometido a un esfuerzo adicional en esta dirección. La combinación de esfuerzos en la dirección del eje del cilindro y perpendicular a este, permiten que la estructura se tuerza generando un liposoma helicoidal. No hemos considerado en esta explicación la curvatura espontánea c_0 . Como fue demostrado por Paredes et al. [13, 14], una proporción adecuada de fosfolípidos (fosfatilserina (SOPS) y fosfatidilcolina PC en su trabajo) con características químicas diferentes, implica tener un valor de curvatura espontánea lo que genera liposomas helicoidales bajo la presencia de flujo. Sin embargo, los resultados presentados en el presente artículo (Figura 2 y Figura 5b) obtenidos con solo un fosfolípido (DOPS) (homogeneidad química) indican que estas topologías particulares también pueden



obtenerse bajo flujo sin necesidad de curvatura espontánea. Un análisis teórico y de simulación computacional, que incluya una ampliación de la teoría de Helfrich, los efectos hidrodinámicos alrededor de la superficie del liposoma, las fuerzas hidrofóbicas y las fluctuaciones termodinámicas considerando Termodinámica de No Equilibrio puede clarificar este fenómeno. De igual manera, el proceso inverso, en el cual un liposoma helicoidal pierde su estructura puede ser ilustrativo (Video 2 de Material suplementario: <http://paginas.fisica.uson.mx/biofisica.molecular/video2.wmv>).

A nuestra consideración, sigue abierta la pregunta sobre el proceso de formación de un liposoma helicoidal.

CONCLUSIONES

Hemos revisado brevemente las teorías clásicas de formación de liposomas. De igual manera hemos planteado las preguntas que a nuestra consideración permanecen abiertas en el tema: ¿Por qué coexisten diferentes estructuras en un sistema de liposomas? ¿Cómo conciliar este polimorfismo con una teoría que considere estabilidad en un sistema con fluctuaciones locales? ¿Cuál es el proceso que lleva a la formación de un liposoma helicoidal?

A partir de la teoría de Helfrich de las constantes elásticas de membranas mostramos que un liposoma cilíndrico puede transformarse en un liposoma helicoidal bajo la presencia de un flujo. Este flujo genera fuerzas normales y axiales que inducen movimiento de las moléculas de fosfolípido. Las fuerzas estéricas e hidrofóbicas compiten con estas fuerzas de origen hidrodinámico, forzando la estructura helicoidal. Los resultados experimentales, muestran por otra parte, que se pueden obtener estos liposomas helicoidales sin necesidad de tener una curvatura espontánea. Debido a lo complicado del fenómeno y las fuerzas involucradas, planteamos la necesidad de extender la teoría de Helfrich y simulación computacional, considerando Termodinámica de No Equilibrio.

ANEXO, MATERIALES Y MÉTODOS

A.1 Moléculas y solvente

Los fosfolípidos utilizados fueron: a) 1-octadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) (SOPS) (C₄₂H₇₉NO₁₀PNa), 812.41 g/mol, y b) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), (DOPS) (C₄₂H₇₇NO₁₀PNa), 810.025 g/mol, ambos aniónicos de pureza mayor al 99% de Avanti Polar Lipids. La estructura química de ambas moléculas se muestra en la figura A.1. En la preparación de muestras se utilizó agua tipo MilliQ con 18.2 MΩcm de resistividad. Fueron utilizados para contraste óptico glucosa y sacarosa con pureza mayor al 95% de Fluka.

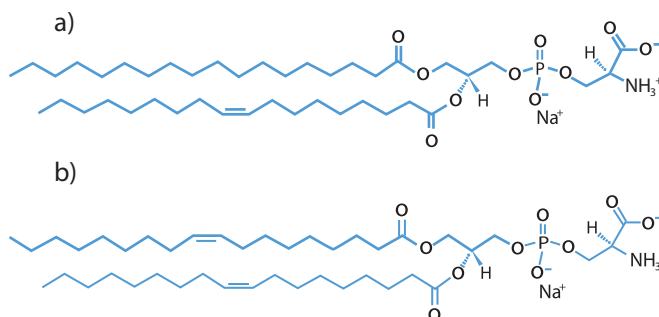


Figura A1. Moléculas de a) SOPS y b) DOPS. Esta última molécula se diferencia de SOPS en tener dos insaturaciones, una en cada cola hidrocarbonada. La estructura química de la cabeza polar, es idéntica (Imágenes tomadas de <http://www.avantilipids.com>).

A.2 Preparación de liposomas

Los liposomas fueron preparados por el método de re-hidratación. El primer paso del método consistió en colocar 10 µg de fosfolípido (disuelto en cloroformo) y secarlo en una campana de vacío a temperatura de laboratorio durante 3 horas. En el segundo paso, la película seca es hidratada con una solución de glucosa/sacarosa a

concentración equimolar de 0.2M que permite lograr un contraste óptico adecuado para la observación por MO y DIC. Después de este paso, las muestras son refrigeradas a 4 °C por un periodo de 24 horas para permitir que todas las moléculas situadas en la película se despeguen del fondo del frasco y se integren a la formación de liposomas. Posteriormente, las muestras son sacadas del refrigerador, agitadas ligeramente y dejadas reposar para que alcancen de nuevo la temperatura de laboratorio; luego, la muestra es colocada en portaobjeto de vidrio para la observación con MO.

A.3 Microscopía Óptica y de Contraste de Interferencia Diferencial

Utilizamos un Microscopio Óptico invertido Olympus DX1 en dos modos de observación: contraste de fase y DIC con objetivo de 60X. El sistema DIC, tiene acoplado prismas Nomarski y polarizadores cruzados para mejorar el contraste de muestras delgadas transparentes aprovechando el fenómeno de interferencia. DIC permite tener así, un gradiente direccional de fase obtenido por dos haces que interfieren constructiva y destructivamente sobre la muestra. Este gradiente, permite tener un cuasi 3D de la muestra observada de modo que las estructuras aparecen realizadas en una dirección. Esta técnica quita las clásicas "aureolas" que aparecen en las estructuras cuando se observa en MO de contraste de fase.

A.4 Microscopía Electrónica de Criofractura

La técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión por Criofractura, involucra los siguientes pasos. Primeramente, un pequeño volumen de la muestra preparada por re-hidratación se congela rápidamente en nitrógeno líquido para preservar las estructuras moleculares. Luego, el espécimen es fracturado a alto vacío para evitar problemas de contaminación y replicación falsa de las estructuras. El último paso es un baño de platino seguido de carbono para asegurar la estabilidad mecánica de la muestra. Se utilizó un Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 2010.

Material suplementario incluye:

- Video 1: Liposoma helicoidal <http://paginas.fisica.uson.mx/biofisica.molecular/video1.wmv>
- Video 2: Desestabilización de un liposoma helicoidal <http://paginas.fisica.uson.mx/biofisica.molecular/video2.wmv>

BIBLIOGRAFÍA

- G. Pabst, N. Kucerka, M-P. Nieh, & J. Katsaras (Eds.), *Liposomes, lipid bilayers and model membranes: From basic research to application*. 2014. pp. 341-360.
- Y. Gambin, R. Lopez-Esparza, M. Reffay, E. Sierrecki, N. S. Gov, M. Genest, R. S. Hodges and W. Urbach, Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *PNAS* 103 (7). 2006. pp. 2098-2102.

- B. M. Ogle and J. L. Platt. The Biology of Cell Fusion: Cells of different types and from different species can fuse, potentially transferring disease, repairing tissues and taking part in development. *American Scientist*. 92 (5). 2004. pp. 420-427.
- G. Lei and R. C. McDonald, Lipid bilayer vesicle fusion: Intermediate captured by high-speed microfluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* 85. 2003. pp. 1585-1599.
- E.-I. Pécheur, I. Martin, O. Maier, U. Bakowsky, J.-M. Ruyschaert, D. Hoekstra. Phospholipid species act as modulators in p97/p47-mediated fusion of Golgi membranes. *Biochem.* 41. 2002. pp. 9813-9823.
- Y. Rahimpour, H. Hamishehkar, Liposomes in cosmetics, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9. 2012. pp. 443-455.
- V. Torchilin, Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* 58 (14). 2006. pp. 1532-1555.
- Dr. A. Gabizon and F. Martin, Polyethylene Glycol-Coated (Pegylated) Liposomal Doxorubicin. *Drugs* 54 (4). 1997. pp. 15-21.
- J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3a ed. Academic Press. 2011.
- W. Helfrich, Elastic Properties of Lipid Bilayers. Theory and Possible Experiments, *Z. Naturforsch. C* 28. 1973. pp. 693-703.
- W. Helfrich, Steric interactions of fluid membranes in multilayer systems, *Z. Naturforsch.* 33a. 1978. pp. 305-315.
- O.-Y. Zhong-Can and W. Helfrich, Instability and Deformation of a Spherical Vesicle by Pressure. *Phys. Rev. Lett.* 59 (21). 1987. pp. 2486-2488.
- G. Paredes-Quijada, H. Aranda-Espinosa y A. Maldonado. Shapes and Coiling of Mixed Phospholipid Vesicles, *Lipids* 44. 2009. pp. 283-289.
- G. Paredes-Quijada, H. Aranda-Espinosa y A. Maldonado. Shapes of Mixed Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Phys.* 32. 2006. pp. 177-181.

